

## 複合脂質に関する生化学的研究

### 第12報 Plasmalogen の分離法に関する研究

徳 嶋 俊 男

札幌医科大学学生化学教室 (主任 大野教授)

#### Biochemical Studies on Compound Lipids XII. On the Procedure of Isolation of Acetal-Phospholipid (Plasmalogen) from Brain

By

TOSIHO TOKUSHIMA

Department of Biochemistry, Sapporo University of Medicine  
(Chief: Prof. K. OIINO)

Acetal-phospholipid (Plasmalogen) は始め Feulgen 及び Bersin<sup>1)</sup> (1939) により馬筋肉より、また最近 Thanhauser 等<sup>2)</sup> (1951) により牛脳髓より結晶状に分離せられ、その構造が Palmital- 及び Stearal-glycerophosphoryl-colamine なることが確認された。著者は牛脳髓より Thanhauser 法に従つて Plasmalogen の純粹分離を試みるとともに、既に大野<sup>3)</sup> (1952) が指摘せる如き、Feulgen 構造以外の構造を有する Plasmalogen の存在の解明に寄與せんと欲し、Feulgen 及び Grünberg<sup>4)</sup> (1938-39) 法の変法なる吉原<sup>5)</sup> (1952) 法に基き、分離操作過程における Plasmalogen の定量的追跡を試みた。

#### 実験方法並びに成績

1) 磷脂質の分割抽出：脳膜及び血管を可及的に除去したのち細碎せる、新鮮なる動物脳髓 (牛, 29 個及び馬, 6 個) 10 kg に、アセトン 25 ℓ を加え時折振盪しながら 50 日間放置後吸引濾過、残渣に再び 32 ℓ のアセトンを加え、室温に 2 週間放置後吸引濾過、両アセトン抽出液は合一され、Plasmal の分析が試みられた。7.37 g の Plasmal の存在が認められたが、この割分よりの Plasmalogen の分

離は試みられなかつた。

アセトン抽出残渣に 96% アルコール 10 ℓ を加え、室温にて時折振盪しながら 4 日間放置後吸引濾過、かくして得られたアルコール抽出液は炭酸氣流中において減圧濃縮せられ、デシケーター中にて乾固された。この第 1 アルコール割分 (AL<sub>1</sub> 割分) の収量は 188 g, 分析により 9.58 g の Plasmal の存在が認められた。

抽出残渣はさらに 3 回、毎回 10 ℓ のアルコールをもつて同様に処理せられ、第 2, 3 及び第 4 アルコール割分 (AL<sub>2</sub>, AL<sub>3</sub> 及び AL<sub>4</sub> 割分) が得られた。収量はそれぞれ 109 g, 66 g 及び 37 g, その Plasmal 含量は 8.13 g, 5.66 g 及び 2.27 g であつた。

アルコール抽出残渣 (3.85 kg) にエーテル 5 ℓ を加え、室温において時折振盪しながら 1 週間放置後吸引濾過、残渣にさらにエーテル 5 ℓ を加え、同様に 2 週間放置後吸引濾過、エーテル抽出液は炭酸氣流中で減圧濃縮された。かくして得られた第 1 及び第 2 エーテル割分の収量は、それぞれ 31.5 g 及び 28.5 g であつた。

エーテル抽出残渣 (3.79 kg) は Protagon 割分の分離に使用された (第 1 図参照)。

2) アルコール割分より Plasmalogen の分離：アルコール割分 (AL<sub>1</sub>, AL<sub>2</sub> 及び AL<sub>3</sub> 割分) について、それぞれ Thanhauser 法に従い Plasmalogen の純粹分離が試

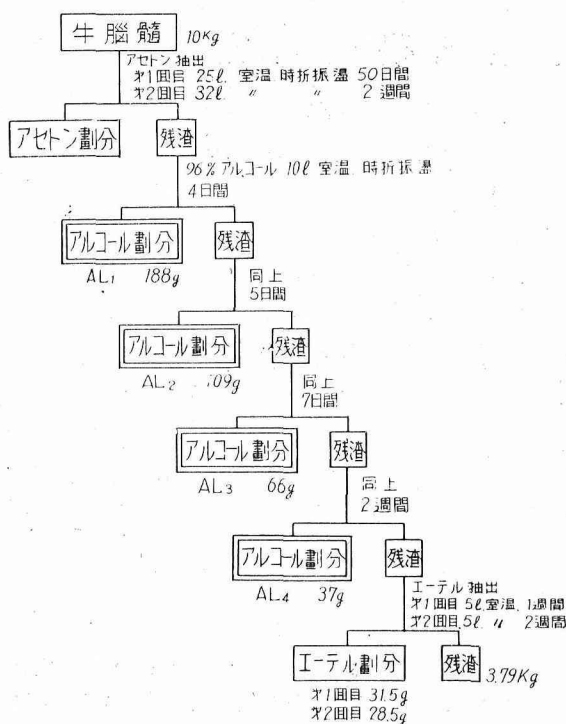
1) Feulgen u. Bersin: Z. physiol. Chem. 260, 217 (1939).

2) Thanhauser et al.: J. Biol. Chem. 188, 417, 423, 430 (1951).

3) 大野: 札幌医誌 3, 128 (1952).

4) Feulgen u. Grünberg: Z. physiol. Chem. 257, 161 (1938-39).

5) 吉原: 札幌医誌 3, 200 (1952).



第 1 図

みられた。

第1アルコール割分 ( $Al_2$  割分) 188 g は室温においてエーテル 500 cc に溶解せられ、白色の不溶物は遠心除去された。エーテル可溶部は炭酸氣流中にて減圧濃縮せられ、硫酸デシケーター中で乾固された。かくして得られた粗燐脂質 180 g を  $ln-NaOH$  800 cc にて乳化し、 $37^{\circ}C$  の孵卵器中で時折振盪しながら1週間放置後、氷醋酸約 35 cc を添加して pH 5 となし、冷やしてのち、冷アセトン 1,600 cc を加えた。吸引濾過、沈澱を冷アセトン各 20 cc にて10回洗滌後、デシケーター中で乾燥せしめた (收量 149 g)。この乾燥物 149 g を  $ln-NaOH$  500 cc 中に乳濁せられ、5日間  $37^{\circ}C$  に放置され、同様の操作により乾燥物 98 g が得られた。これはさらに  $ln-NaOH$  400 cc にて同様に処理された。かくして不鹼化物 92 g が得られた。

この不鹼化物 (92 g) はエーテル 900 cc をもつて室温において抽出せられ、遠心分離後上清は減圧濃縮，デシケーター中で乾固された。かくしてエーテル可溶割分 (33.8 g) が得られた。不溶残渣はさらに Soxhlet 抽出器を用いてエーテル 300 cc をもつて連続抽出せられ、エーテル可溶割分 (10 g) と不可溶割分 (37 g) とに分けられた。

エーテル可溶割分 (A<sub>1</sub> 割分 43.8 g) は Thanhauser 法に従つて Plasmalogen の純粋分離が試みられた。即ちその

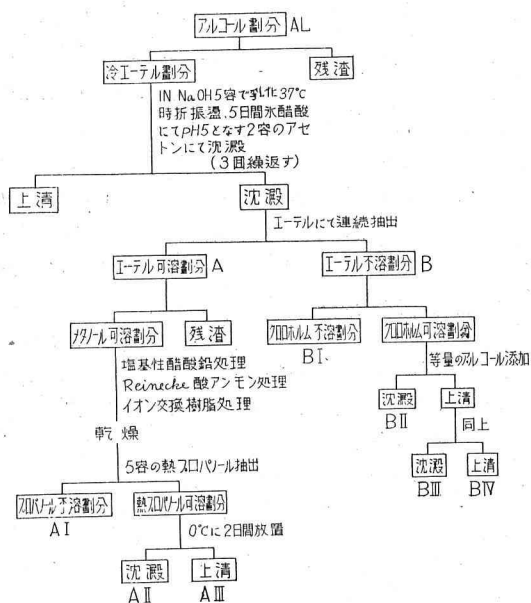
40.8 g は 97% アセトンにて数回、さらに無水アセトンにて数回洗滌後、800 cc の熱メタノールをもつて浸出せられ、一夜室温に放置される。メタノール不溶物を濾去し、メタノール溶液を5容のメタノールをもつて稀釈後、塩基性醋酸鉛を絮状沈澱がそれ以上増加しなくなるまで加え、さらに沈澱を完全ならしめるために数滴のアンモニアを加える。濾過後、濾液は  $H_2S$  にて処理せられ硫化鉛を除去、通氣された透明な濾液はイオン交換樹脂 (Amberlite IR 4B) をもつて、濾液が最早酸性でなくなるまで約1時間振盪される。

交換樹脂を濾去後、濾液は 400 cc にまで減圧濃縮せられ、Reinecke-酸安門の飽和メタノール溶液 20 cc が加えられる。一晩 0°C に放置後沈澱を濾去、酸化銀 10~20 g を加えて 4~5 時間振盪することにより、過剰の Reinecke-酸を銀塩として濾去し、微黄色アルカリ性の濾液は H<sub>2</sub>S 処理により銀イオン除去、通気後再びイオン交換樹脂 (Amberlite IR 4B) にて酸性でなくなるまで約 2 時間処理された。交換樹脂を濾去後、濾液は減圧濃縮、デシケーター中で乾固された (収量 3.5 g)。この乾燥物はさらに 97% アセトン各 30 cc にて 5 回、無水アセトン各 30 cc にて 5 回洗滌後、100 cc の熱メタノールをもつて浸出溶解された。メタノール溶液は冷後、イオン交換樹脂 (Amberlite IRC 50) とともに 30 分間振盪せられ、樹脂を濾去後、減圧濃縮デシケーター中で乾固された (収量 3 g)。この乾燥粉末は熱プロパノール 15 cc をもつて浸出溶解せられ、熱時遠心分離、不溶物はさらに熱プロパノール 5 cc にて洗滌された。熱プロパノール不溶物はデシケーター中で乾燥された (A<sub>1</sub>I 劃分 収量 0.88 g)。上清並びに洗滌液は合一され 15 cc にまで減圧濃縮せられ、氷室中に 2 日間放置、発生せる白色結晶性沈澱は遠心分離せられ、デシケーター中で乾固された (A<sub>1</sub>II 劃分 収量 0.45 g)。上清は減圧濃縮乾固された (A<sub>1</sub>III 劃分 収量 0.3 g)。

エーテル不溶割分 (B<sub>I</sub> 割分) の 1.0 g をクロロホルム 10 cc に加温溶解せしめ、4°C に 30 分間放置後遠心分離により不溶部分を得た (B<sub>I</sub>I 割分 収量 0 g 痕跡的)。上清液に等量の無水アルコールを撹拌しながら添加し、4°C に 30 分間放置後沈澱物を遠心分離する (B<sub>I</sub>II 割分 収量 11.8 g)。上清にさらに等量の無水アルコールを加え、4°C に 30 分間放置後発生せる沈澱物を遠心分離する (B<sub>I</sub>III 割分 収量 6.0 g)。上清は減圧濃縮乾固される (B<sub>I</sub>IV 割分 収量 14.0 g)。

第2アルコール割分 (AL<sub>2</sub> 割分) 109 g 及び第3アルコール割分 (AL<sub>3</sub> 割分) 66 g より、前と全く同様の操作によりエーテル可溶割分 (A<sub>2</sub> 及び A<sub>3</sub> 割分) 18.5 g 及び 17.8 g、並びにエーテル不溶割分 (B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 割分) 21.0 g 及び 7.0 g が得られた。さらに同様の操作によつてエーテル可溶割分

よりは、熱プロパノール不溶割分 ( $A_2I$  及び  $A_3I$  割分) 0.67 g 及び 1.8 g, 冷プロパノール不溶割分 ( $A_2II$  及び  $A_3II$  割分) 0.30 g 及び 0.40 g, 並びに冷プロパノール可溶割分 ( $A_2III$  及び  $A_3III$  割分) 0.45 g 及び 0.45 g が得られた。またエーテル不溶割分よりは、クロロホルム不溶割分 ( $B_2I$  及び  $B_3I$  割分) 0 g 及び 0.6 g, クロロホルム・アルコール (1:1) 不溶割分 ( $B_2II$  及び  $B_3II$  割分) 7.9 g 及び 4.2 g, クロロホルム・アルコール (1:3) 不溶割分 ( $B_2III$  及び  $B_3III$  割分) 3.0 g 及び 0 g, 並びに可溶割分 ( $B_2IV$  及び  $B_3IV$  割分) 10.5 g 及び 1.5 g が得られた (第 2 図参照)。



第 2 図

Thanhauser 等が結晶性 Plasmalogen を分離せる冷プロパノール不溶割分 ( $A_2II$ ,  $A_3II$ ,  $A_3III$  割分) は、少量のメタノールより数回再結晶が試みられたが、得られた白色粉末の分析結果は第 1 表に示される如く、Feulgen 構造の

第 1 表 メタノール再結晶後の AII 割分

	理論値 (%)	実験値 (%)
Plasmal	54.91	10.62
燐	7.1	1.04
グリセロール	21.0	4.27
コラミン	13.97	6.60
ガラクトーゼ	0	1.19

Plasmalogen の理論値とは遙かに相違し、約 20% の Plasmalogen と約 80% の未知の物質よりなることが認められ

た。

3) 各割分の Plasmal 分析結果: 各アルコール割分の Plasmal 含量は、第 2 表の如く大略 5~8% である。し

第 2 表 各アルコール割分の Plasmal 含量

	重量 (g)	Plasmal (g)	(%)
$AL_1$	188	9.58	5.09
$AL_2$	109	8.13	7.46
$AL_3$	66	5.66	8.57
$AL_4$	37	2.27	6.13

かるに Thanhauser 法に従つてアルカリ処理により得られたエーテル可溶 ( $A_1$ ,  $A_2$ , 及び  $A_3$ ) 並びにエーテル不溶 ( $B_1$ ,  $B_2$ , 及び  $B_3$ ) 割分においては、 $A_1$  (1.02%),  $A_2$  (1.56%) 及び  $B_3$  (3.86%) は Plasmal 含量が低下し、 $B_1$  (6.54%),  $B_2$  (9.71%) 及び  $A_3$  (6.62%) が Plasmal 含量の上昇を示したことが注目される (第 3~5 表参照)。

第 3 表  $AL_1$  の各割分における Plasmal 含量

	重量 (g)	Plasmal (mg)	(%)
$A_1$	40.8	440.	1.02
$A_1I$	0.88	22.2	2.52
$A_1II$	0.45	31.4	6.99
$A_1III$	0.3	36.4	12.14
$B_1$	37.0	2,419.8	6.54
$B_1I$	0	0	0
$B_1II$	11.8	1,463.2	12.4
$B_1III$	6.0	636.0	12.6
$B_1IV$	14.4	226.8	1.6

第 4 表  $AL_2$  各割分における Plasmal 含量

	重量 (g)	Plasmal (mg)	(%)
$A_2$	18.0	290.0	1.56
$A_2I$	0.67	5.4	0.81
$A_2II$	0.30	41.9	13.97
$A_2III$	0.45	60.5	13.44
$B_2$	21.0	2,040	9.71
$B_2I$	0	0	0
$B_2II$	7.9	1,018.3	12.89
$B_2III$	3.0	418.0	13.95
$B_2IV$	10.5	161.7	1.54

第5表 AL<sub>3</sub>各割分における Plasmal 含量

	重 量 (g)	Plasmal (mg)	(%)
A <sub>3</sub>	17.8	1,180	6.62
A <sub>3</sub> I	1.8	10.6	0.59
A <sub>3</sub> II	0.4	4.6	1.17
A <sub>3</sub> III	0.45	53.9	11.97
B <sub>3</sub>	7.0	270	3.86
B <sub>3</sub> I	0.6	8.4	1.40
B <sub>3</sub> II	4.2	352.8	8.40
B <sub>3</sub> III	0	0	0
B <sub>3</sub> IV	1.5	11.5	0.77

エーテル可溶割分 (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> 及び A<sub>3</sub> 割分) を、さらに Thanhauser 等の Plasmalogen 純粹分離法に従つて分割した結果は、Thanhauser 等が結晶性 Plasmalogen を得たるプロパノール可溶割分に Plasmal が最も濃縮せられていることが認められた。一方エーテル不溶割分 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 及び B<sub>3</sub> 割分) を Folch<sup>6)</sup> (1949) 法に従つてクロロホルム・アルコール分割をなせる結果は、難溶割分 B<sub>1</sub>II (12.4%), B<sub>2</sub>II (12.89%) 及び B<sub>3</sub>II (8.40%), 並びに B<sub>1</sub>III (10.6%), B<sub>2</sub>III (13.95%) 及び B<sub>3</sub>III (9.27%) が高い Plasmal 含量を示すことが注目された。この割分は Folch 等がイノシトール磷脂質を分離せる割分であつて、この事實は Thanhauser 等が分離せる Feulgen 構造の Plasmalogen が、脳髄中に存する Plasmalogen の極く一部を占めるに過ぎないという事実とともに、Plasmalogen 中には Feulgen 構造以外の構造を有するもの、恐らくその中には、イノシトールを含有するものが存在するであろうことを示唆するものであり、極めて注目に値すると考えられる。

### 考 按

Feulgen 及び Bersin (1939) は、馬筋肉 10 kg よりアルコール抽出によつて得たる粗磷脂質を、水にて乳化せしめ 3% KOH にて 100°C に 20 分間処理後、ブルシン・醋酸混液にて中和、沈澱をアセトンにて充分洗滌することにより、粗 Plasmalogen 約 7~8 g を分離し、さらに複雑な結製法により結晶 Plasmalogen 1 g を得、その水解構成成分の分離確認により Palmital-及び Stearal-glycerophosphoryl-colamine なる構造を興えた。吉原 (1952) によれば、家兎及び白鼠筋肉の Plasmalogen 含量は 0.05~0.08% であるが、この値を馬筋肉にも適用するならば、その 10 kg 中には 5~8 g の Plasmalogen を含有することとなる。従つ

て筋肉 Plasmalogen の総てが Feulgen 構造を有するか否かは、なお検討の余地が残されている。

大野 (1952) は脳髄 Plasmalogen の水解産物の分離並びに定量的分析により、Feulgen 構造の Plasmalogen の他に、飽和アルデヒドの代りに  $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和アルデヒドを有するもの、コラミンの代りにセリンを有するもの、またグリセロールの他にイノシトールを有する Plasmalogen の存在を強く示唆したが、結晶性 Plasmalogen の分離に成功していないので、確認するには至っていない。

Thanhauser 等 (1951) は牛脳髄 9 kg より得たる粗磷脂質を、In-NaOH をもつて 37°C 数日間処理することによつて鹼化し、不鹼化物のエーテル可溶割分より複雑な処理の後、結晶性 Plasmalogen 1~2 g を分離し、その水解構成成分の分離確認により、Feulgen 構造を再確認するとともに、そのグリセロ磷酸が  $\alpha$  型なることを報告している。吉原 (1952) によれば家兎並びに白鼠脳髄の Plasmalogen 含量はほぼ 0.6~0.7% であつて、この数値が牛脳髄に適用されるならば、その 9 kg 中には約 60 g の Plasmalogen が存することとなり、Thanhauser 等の分離せる結晶性 Plasmalogen はその極く一部に過ぎず、従つて、Feulgen 構造以外の脳髄 Plasmalogen の存在を否定し得ない。

本実験においては牛脳髄 10 kg より分割抽出されたアルコール割分中には、Plasmal として 25 g、従つて Plasmalogen として大略 45 g が含有せられていた。このアルコール割分を Thanhauser 法によつて鹼化し、不鹼化物をエーテル可溶及びエーテル不溶割分に分割せるに、エーテル可溶割分 (総量 77.1 g) 中には Plasmal として 1.91 g が含有されるに過ぎないに反して、エーテル不溶割分 (総量 65.0 g) 中には Plasmal として 4.72 g が含まれ、従つて脳髄 Plasmalogen の主体はエーテル不溶割分中に存することが明白となつた。

エーテル可溶割分より、Thanhauser 法に従つて結晶性 Plasmalogen の分離を試みた結果は、冷プロパノール不溶割分中に結晶性物質を得たが、その分析の結果は Feulgen 構造の Plasmalogen 約 20% と、未知物質約 80% よりなることが認められた。

エーテル不溶割分を Folch 法に従つて、クロロホルム・アルコール分割を行えるに、Plasmalogen が主としてその難溶割分中に濃縮される事実を認めた。このことは脳髄 Plasmalogen の主体が、Feulgen 構造以外の Plasmalogen により占められるものであることを示唆するものとして、極めて注目に値する。

6) Folch : J. Biol. Chem. 177, 497, 505 (1949).

## 綜 括

1) 牛脳髓 (10 kg) よりアセトン, アルコール及びエーテルによる分割抽出が行われ, そのアルコール割分より, まず Thanhauser 法によつて不鹼化割分が分離せられ, それはエーテル可溶及び不溶割分に分割された。

2) エーテル可溶割分はさらに Thanhauser 法により分割せられ, Thanhauser 等が結晶性 Plasmalogen を分離したるプロパノール可溶割分に, 最も Plasmalogen が濃縮せられることを確認したが, 分析の結果は約 20% の Plasmalogen と約 80% の未知物質よりなることが認められた。この割分より得られる Plasmalogen 即, Than-

hauser 等が分離せる Feulgen 構造の Plasmalogen は, 脳髓 Plasmalogen の極く一部に過ぎず, 従つて大野 (1952) が予示せる如く, Feulgen 構造以外の Plasmalogen の存在の可能性が明白となつた。

3) Thanhauser 等が顧慮しなかつたエーテル不溶割分が, 可溶割分に比してより多量の Plasmalogen を含有することが認められた。この不溶割分においては Plasmalogen は主として, Folch (1949) のクロロホルム・アルコール分割法による難溶割分中に濃縮された。この事実はイノシトールを含有する Plasmalogen の存在を強く示唆するものであり, 極めて注目に値する。

(昭和 29. 2. 22 受付)

## Summary

10 kgm of fresh beef brain were minced and dried with acetone. The dried brain was extracted with 10 liters of 96% alcohol at room temperature for a week. The process was repeated three times. Each of the alcoholic extracts was worked on separately in the same way. The extract was concentrated to dryness and was saponified by Thanhauser's (1951) method.

The dried saponified material was extracted with ether in a continuous extractor, and the ethereal extract was evaporated to dryness (Fraction-A). The residue from the extraction was placed in a vacuum desiccator (Fraction-B).

Fraction-A was investigated following Thanhauser's (1951) procedure. The crystalline precipitate, obtained from propanol solution, was recrystallized several times from hot methanol. This substance, after being thoroughly dried, was analysed for fatty aldehyde, glycerol, phosphorus and colamine. Upon analysis it proved to be only 20% pure plasmalogen of Feulgen's (1939) structure (an acetal of glycerophosphoryl-colamine).

Fraction-B was fractionated using the chloroform-alcohol method, as described below. 1 gm of Fraction-B was dissolved in 10 cc of chloroform. The centrifuged insoluble part was collected (BI). Then 10 cc of absolute ethyl alcohol was added to the clear supernatant. After allowing to stand for 30 minutes at 4°C, precipitates formed, were collected by centrifugation (BII). An equal amount of alcohol was added to the clear supernatant solution. The mixture was allowed to stand at 4°C for 30 minutes and was centrifuged (the precipitate, BIII). The supernatant solution was concentrated to dryness (BIV).

On analysis it showed that BII, BIII (these fractions appear to be identical with, or closely related to phosphatidyl serine and phosphoinositide fractionated from brain cephalin by Folch (1949)) contained amounts of plasmalogen, probably inositol-, serine-containing plasmalogen.

This is in agreement with the suggestion, demonstrated by Ohno (1952).

(Received Feb. 22, 1954)